

CHROM. 8377

## DOSAGE DE LA CHLOROQUINE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

A. VIALA, J. P. CANO et A. DURAND

*Laboratoire de Toxicologie Générale et Biotoxicologie, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille (France)*

(Reçu le 19 mars 1975)

### SUMMARY

#### *Determination of chloroquine in biological material by gas-liquid chromatography*

A method is developed for the gas chromatographic determination of chloroquine after extraction from biological material, using medazepam as the internal standard and a column filled with 3% OV-17 on Gas-Chrom Q. The detection limits are: 0.15  $\mu\text{g/ml}$  of urine, 0.25  $\mu\text{g/ml}$  of whole blood, and 1.50  $\mu\text{g/g}$  of tissue. The technique can be applied in toxicological analysis and in monitoring drug levels.

### INTRODUCTION

La chloroquine, qui occupe une place importante dans le traitement et la prévention du paludisme, peut aussi être à l'origine d'intoxications graves, voire mortelles. Pour la rechercher et la doser dans les milieux biologiques, nous avons mis à profit au cours de précédents travaux<sup>1-4</sup> trois groupes de techniques: (i) la chromatographie sur couche mince, qui permet la caractérisation de la chloroquine, mais se prête difficilement à elle seule au dosage; (ii) la spectrophotométrie dans l'ultra-violet, qui conduit rapidement à des résultats aussi bien qualitatifs que quantitatifs, mais pêche par la médiocrité de sa précision; (iii) la spectrofluorimétrie qui, insuffisante pour l'établissement d'un critère d'identification, autorise en revanche des dosages d'une grande sensibilité.

Il nous est apparu utile d'étudier aussi les possibilités de détermination qualitative et quantitative offertes par la chromatographie en phase gazeuse. Plusieurs auteurs ont déjà appliqué ce procédé à l'identification de la chloroquine ou à sa recherche dans les milieux biologiques. VandenHeuvel *et al.*<sup>5</sup> en envisagent la séparation dans le cadre d'une étude d'ensemble sur plusieurs séries médicamenteuses. Holtzman<sup>6</sup> parvient à en déceler jusqu'à 5 ng grâce à un détecteur à capture d'électrons. Kazyak et Knoblock<sup>7</sup> emploient des colonnes à 1% de SE-30 (diméthylsilicone) sur Chromosorb W ou à 3% de QF-1 (fluorosilicone) et un détecteur à ionisation d'argon. Robinson *et al.*<sup>8</sup> se servent d'une colonne à 3.8% de SE-30 sur Diatoport S reliée à un détecteur à ionisation de flamme. Nous-mêmes avons fait usage antérieure-

ment d'une colonne en verre à 3% de SE-30 sur Chromosorb G AW DMCS et de l'ionisation de flamme pour assurer la détection de l'antipaludique dans l'urine à l'occasion d'une intoxication.

Au cours de nos nouveaux essais nous avons testé une phase stationnaire peu polaire, l'OV-1 (diméthylsilicone), couplée à l'Igepal (nonylphénoxy polyoxyéthylène éthanol) dans le but de réduire autant que possible le "tailing" de la chloroquine, une phase plus polaire, le XE-60 (cyanoéthylméthyl diméthylsilicone) additionné également d'Igepal, puis une phase thermiquement stable et de polarité moyenne sur laquelle notre choix s'est finalement arrêté: l'OV-17 (méthylphényl silicone), à des taux d'imprégnation divers.

Pour l'étalonnage, nous avons eu recours à la méthode dite de l'étalon interne. Nous nous sommes donc attachés à rechercher un produit de référence qui présente des caractéristiques d'extraction (pH optimum, solubilité dans les solvants organiques) et de comportement chromatographique assez proches de celles de la chloroquine, mais d'un groupe chimique et thérapeutique différent. Une benzodiazépine, le médazépam ("Nobrium" N.D. ou "Ro 5-4556") répondait à ces critères (Fig. 1). Nous savions aussi que ce composé n'est pas sensible à l'hydrolyse acide, ce qui constituait une garantie sur le plan de la stabilité. Un étalonnage a été réalisé avec des solutions dans le mélange heptane-1,2-dichloroéthane (80:20) contenant une quantité constante de médazépam, 0.050  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , et des quantités croissantes de chloroquine. Le graphique construit en portant le rapport des surfaces des pics de la chloroquine et de l'étalon en fonction des concentrations en antipaludique dans la prise d'essai (Fig. 2) est une droite entre 0.03 et 0.20  $\mu\text{g}$  de chloroquine base par  $\mu\text{l}$ .

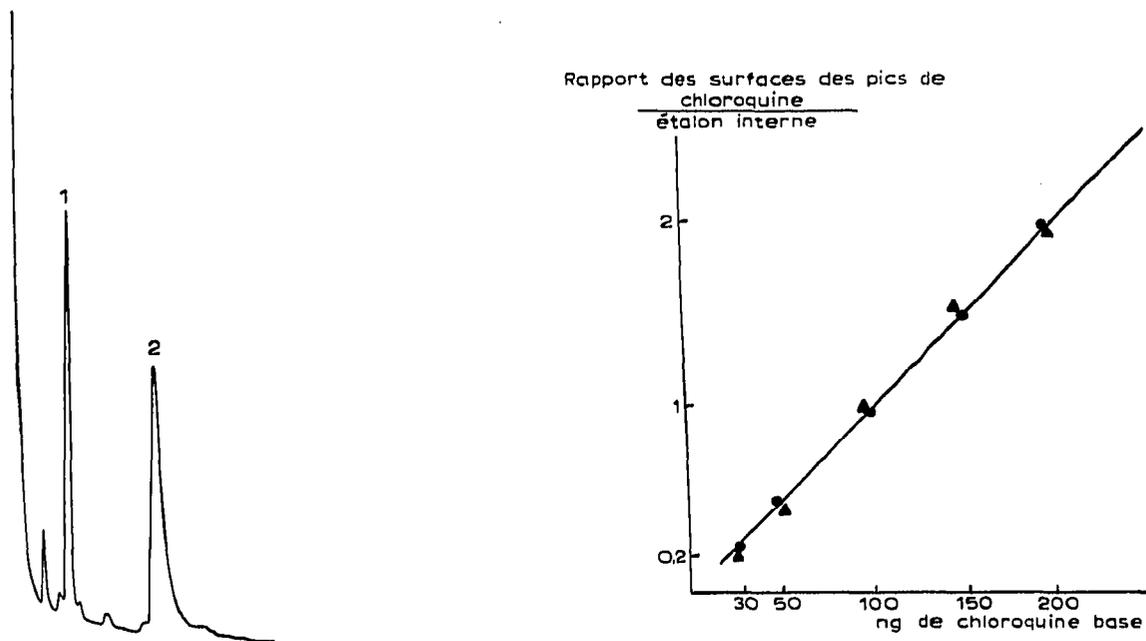


Fig. 1. Exemple de chromatogramme obtenu à partir de l'urine d'un intoxiqué (atténuation 0,1-16). 1 = Médazépam ("nobrium"); 2 = chloroquine.

Fig. 2. Exemple de graphiques d'étalonnage. ●, Étalonage direct; ▲, étalonage après extraction simulée à partir de l'urine.

## PROTOCOLE ANALYTIQUE

*Paramètres chromatographiques*

Les paramètres chromatographiques appliqués sont les suivants: appareil, "Aerograph 1520 B"; détecteur, à ionisation de flamme; colonne, acier inoxydable, 1/8 in. de diamètre, 1.50 m de longueur, à 3% d'OV-17 sur Gas-Chrom Q (100-120 mesh); températures, de l'injecteur 280°, de la colonne 240° et du détecteur 325°; débits gazeux, azote U 40 ml/min, hydrogène 30-32 ml/min et air 350 ml/min; enregistreur, Honeywell 1 mV.

*Application à l'urine*

Dans un tube cylindrique bouchant émeri, introduire 10 ml de l'urine à analyser et 1 ml de solution d'étalon interne (médazépam à 5 µg/ml dans HCl 0.1 N). Dans cinq tubes identiques, ajouter à 10 ml d'urine (urine provenant d'un sujet humain n'ayant pris aucun médicament dans les huit jours précédents), 1 ml de la solution d'étalon interne et des concentrations croissantes de sulfate de chloroquine (3-5-10-15-20 µg exprimés en chloroquine base). Alcaliniser au moyen d'une solution aqueuse de potasse à 60% jusqu'à pH compris entre 10 et 11. Ajouter 10 ml d'éther (déperoxydé et redistillé). Obturer le tube. Agiter mécaniquement pendant 10 min. Centrifuger et transvaser par aspiration la phase organique dans un autre tube. Renouveler deux fois l'extraction; réunir les phases étherées. Concentrer au 1/10 du volume environ et mettre en contact la phase organique avec 10 ml d'acide sulfurique 0.1 N. Agiter pendant 10 min, centrifuger. Eliminer la phase étherée par aspiration au moyen d'une trompe à vide. Renouveler deux fois l'extraction par l'acide sulfurique 0.1 N. Réunir les phases acides et les laver à deux reprises au moyen de 5 ml d'heptane\*. Rejeter l'heptane. Amener la phase aqueuse résiduelle à pH 10-11 avec de l'hydroxyde de sodium à 40%. Extraire la phase aqueuse ainsi alcalinisée au moyen de 30 ml d'éther utilisé en trois fois. Après centrifugation, transvaser la phase étherée dans un tube cylindro-conique de 30 ml de capacité. Evaporer l'éther sous léger courant d'azote à une température voisine de 40°. Dissoudre le résidu dans un volume de 100 µl environ du mélange heptane-1,2-dichloroéthane (80:20). Homogénéiser au moyen d'un vibreur ("whirlmixer") et injecter de 1 à 2 µl de cette solution dans la colonne chromatographique.

Le graphique d'étalonnage obtenu à partir des cinq urines standards (Fig. 2) permet de constater qu'il y a linéarité pour des concentrations en chloroquine comprises entre 3 et 20 µg dans la prise d'essai d'urine; la droite, qui est pratiquement superposable à celle établie par étalonnage direct, sert de référence pour l'échantillon d'urine examiné.

*Application au sang*

Des prises d'essai de 6 ml du sang à analyser (sang total) et de "blancs" (sang provenant d'un sujet humain exempt de toute thérapeutique médicamenteuse depuis huit jours) sont additionnées de 6 ml de solution aqueuse de potasse à 60% et maintenues pendant 3 min au bain-marie bouillant: La chloroquine éventuellement pré-

\* Nous avons retenu l'heptane comme solvant car, lorsque l'extraction porte sur le plasma, ce solvant permet une délipidation suffisante pour une analyse chromatographique.

sente dans l'essai est ainsi libérée de ses liaisons protéiques. Après refroidissement, l'essai, additionné de 5  $\mu\text{g}$  de médazépam, et les "blancs" additionnés de 5  $\mu\text{g}$  de médazépam et de quantités croissantes de chloroquine, sont traités selon le même protocole que celui applicable à l'urine.

#### *Application aux tissus*

Des prises d'essai de 1 g du tissu à analyser et de "blancs" (foie de veau par exemple) sont dilacérées et homogénéisées. L'essai, additionné de 5  $\mu\text{g}$  de médazépam, et les "blancs", additionnés de 5  $\mu\text{g}$  de médazépam et de quantités croissantes de chloroquine, sont agités vigoureusement avec 10 ml d'acide chlorhydrique 0.1 N. Après 12 h de repos, les mélanges sont amenés à pH 10–11 par addition de potasse à 60%. Les opérations ultérieures sont conduites dans les mêmes conditions que pour l'urine.

#### DISCUSSION

L'usage d'un étalon interne est avantageux à plusieurs points de vue. Outre que la détermination est spécifique de la chloroquine, il n'est plus nécessaire de mesurer exactement le volume d'injection (on supprime ainsi toute erreur de mesure lors de l'injection: le volume doit cependant se situer entre 1 et 2  $\mu\text{l}$ ), ni de tenir compte des pertes consécutives à l'extraction, puisqu'elles sont théoriquement identiques à celles produites pour l'étalonnage; il n'y a donc plus de coefficient de récupération à appliquer. De plus, le volume de reprise du résidu terminal peut être variable. Nous l'avons fixé à 100  $\mu\text{l}$  environ au cours de nos essais de simulation de façon à avoir des chromatogrammes se prêtant facilement à l'interprétation quantitative avec une atténuation de 0.1–16 affichée à l'électromètre: Nous admettons comme limite inférieure pour un dosage précis une hauteur du pic de chloroquine de 2 cm, équivalant à 3  $\mu\text{g}$  pour la prise d'essai primitive de matériel biologique. La limite de sensibilité peut encore être divisée par deux si l'on prend soin de construire les droites d'étalonnage en abaissant à 2.5  $\mu\text{g}$  la quantité d'étalon interne ajoutée aux prises d'essai et d'effectuer la reprise du résidu terminal par 50  $\mu\text{l}$  de solvant. Inversement, si la teneur en chloroquine est supérieure à 80  $\mu\text{g}$  pour la prise d'essai, le volume de reprise du résidu final devra être augmenté.

Comme le montre le Tableau I, la technique de chromatographie en phase gazeuse se situe, sur le plan de la sensibilité, entre la spectrophotométrie dans l'ultra-

TABLEAU I

LIMITES DE SENSIBILITÉ DES TECHNIQUES DE DOSAGE EN  $\mu\text{g}$  DE CHLOROQUINE BASE PAR ml OU PAR g DE MATÉRIEL BIOLOGIQUE

|        | <i>Spectrofluorimétrie</i> | <i>Chromatographie en phase gazeuse</i> | <i>Spectrophotométrie dans l'ultra-violet</i> |
|--------|----------------------------|---|---|
| Urine  | 0.10                       | 0.15                                    | 0.90  |
| Sang   | 0.17                       | 0.25                                    | 1.50  |
| Tissus | 1.10                       | 1.50                                    | 9.00  |

violet et la spectrofluorimétrie, tout en étant très proche de cette dernière\*. Elle présente en outre l'intérêt de fournir en une seule opération un résultat à la fois qualitatif et quantitatif. Elle peut se prêter à des analyses toxicologiques et rendre également des services dans le domaine de la pharmacovigilance.

#### RÉSUMÉ

Après extraction des milieux biologiques, la chloroquine est dosée par chromatographie en phase gazeuse, en utilisant le médazépam comme étalon interne et une colonne à 3% d'OV-17 sur Gas-Chrom Q. Les limites de sensibilité pour une détermination quantitative valable sont de 0.15 µg/ml d'urine, 0.25 µg/ml de sang total et 1.50 µg/g de tissus. La technique peut avoir des applications en toxicologie analytique et dans le domaine de la pharmacovigilance.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. Viala, A. Durand, J. P. Cano et J. Jouglard, *J. Eur. Toxicol.*, 5 (1972) 189.
- 2 A. Viala, F. Gouezo et A. Durand, *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 33 (1973) 389.
- 3 A. Viala, F. Gouezo et A. Durand, *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 33 (1973) 399.
- 4 A. Durand, *Thèse Pharmacie (État)*, Marseille, 1974.
- 5 W. J. A. VandenHeuvel, E. O. A. Haahti et E. C. Horning, *Clin. Chem.*, 8 (1962) 351.
- 6 J. L. Holtzman, *Anal. Biochem.*, 13 (1965) 66.
- 7 L. Kazyak et E. C. Knoblock, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 1448.
- 8 A. E. Robinson, A. I. Coffèr et F. E. Camps, *J. Pharm. Pharmacol.*, 22 (1970) 700.
- 9 A. Viala, J. P. Cano, F. Gouezo et J. Catalin, *Ann. Biol. Clin.*, 26 (1968) 979.

---

\* Pour une appréciation seulement qualitative, on peut admettre que la technique est encore deux fois plus sensible environ.